



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE MATERIÁLŮ

INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE

SEPARACE LIPIDŮ Z BUNĚČNÝCH TKÁNÍ

SEPARATION OF LIPIDS FROM CELL TISSUES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Vojtěch Kotland

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Tomáš Svěrák, CSc.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1342/2018
Ústav: Ústav chemie materiálů
Student: **Bc. Vojtěch Kotland**
Studijní program: Chemie, technologie a vlastnosti materiálů
Studijní obor: Chemie, technologie a vlastnosti materiálů
Vedoucí práce: **prof. Ing. Tomáš Svěrák, CSc.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Separace lipidů z buněčných tkání

Zadání diplomové práce:

- 1) Literární rešerše chemicko-inženýrských postupů získávání lipidů z buněčných tkání.
- 2) Laboratorní experimenty separace tuků z buněčných tkání.
- 3) Vyhodnocení experimentálních prací.

Termín odevzdání diplomové práce: 10. 5. 2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Vojtěch Kotland
Student

prof. Ing. Tomáš Svěrák, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. František Šoukal, Ph.D.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31. 1. 2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá separací lipidů z buněčných tkání. Práce je rozdělena na teoretickou a experimentální část. V teoretické části jsou shrnuty informace o lipidech, jejich vlastnostech a metodách používaných k jejich separaci z buněčných tkání. Porovnáním metod separace je zvolena jedna, která je poté aplikována v experimentální části. V závěru teoretické části je uvedeno několik vědeckých prací zabývajících se výzkumem v dané oblasti chemie. V experimentální části jsou popsány faktory ovlivňující zvolenou metodu separace lipidů z buněčných tkání. Měření byla volena tak, aby je bylo možné snadno reprodukovat. Pro každý faktor byly experimentálně zjištěny hodnoty, které zvyšovaly množství separovaného tuku. Faktory byly mezi sebou porovnány a jejich sumarizací bylo dosaženo optimalizace celé metody.

ABSTRACT

This master's thesis is focused on lipid separation from tissue cells. Thesis is divided into theoretical and experimental part. In the theoretical part is summarized current knowledge about lipids, their properties and methods used to separate them from tissue cells. Those methods were compared and one of them was chosen to be used in the experimental part. Theoretical part is ended with reviews aimed towards the research in this area of chemistry. Experimental part describes factors affecting chosen method of lipid separation from tissue cells. The measurements were chosen so that they could be easily reproduced. Values for each factor were experimentally determined to increase the amount of fat separated. All factors were compared and based on their summarization the optimization for whole method was produced.

KLÍČOVÁ SLOVA

Lipidy, separace lipidů, buněčné tkáně, extrakce, rozpouštědlo

KEYWORDS

Lipids, lipid separation, cell tissues, extraction, solvent

KOTLAND, Vojtěch. *Separace lipidů z buněčných tkání*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113396>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie materiálů. Vedoucí práce Tomáš Svěrák.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval prof. Ing. Tomáši Svěrákovi, CSc. za odborné vedení, přátelský přístup a množství cenných rad při zpracování této diplomové práce. Dále bych také chtěl poděkovat rodině a přátelům za podporu a pomoc v průběhu studia.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Lipidy.....	8
2.1.1	Jednoduché lipidy.....	8
2.1.2	Složené lipidy.....	8
2.1.3	Odvozené lipidy a jejich prekurzory.....	9
2.2	Mastné kyseliny.....	9
2.2.1	Nasycené mastné kyseliny.....	10
2.2.2	Monoenové mastné kyseliny.....	10
2.2.3	Polyenové mastné kyseliny.....	10
2.3	Buněčná tkáň.....	10
2.3.1	Epitely.....	10
2.3.2	Pojivové tkáně.....	10
2.3.3	Svalové tkáně.....	11
2.3.4	Nervové tkáně.....	11
2.4	Metody stanovení lipidů.....	11
2.4.1	Extrakce lipidů.....	12
2.4.2	Analytická separace, identifikace a kvantifikace lipidů.....	16
2.5	Současný výzkum v oblasti separace lipidů.....	18
2.5.1	Srovnání metod extrakce podle Soxhleta a MAE.....	18
2.5.2	Vliv teploty a vlhkosti na extrakci lipidů za vysokého tlaku.....	19
2.5.3	Extrakce lipidů z tkání nízko-toxickým rozpouštědlem.....	19
2.5.4	Extrakce lipidů z kukuřice a ovsu za sníženého tlaku.....	19
2.5.5	Superkritická extrakce lipidů.....	20
3	Cíle práce.....	22
4	Experimentální část.....	23
4.1	Použité chemikálie.....	23
4.2	Přístrojové vybavení	23
4.2.1	Filtrační aparatura.....	23
4.2.2	Hydraulický lis.....	23
4.2.3	Magnetická míchačka s ohřevem.....	24
4.2.4	Konvekční skříňková sušárna.....	24
4.3	Charakteristika vzorku.....	25
4.4	Extrakce lipidů.....	26
4.4.1	Princip metody.....	26

4.4.2	Pracovní postup.....	27
4.5	Opakovatelnost.....	27
4.6	Statistické vyhodnocení naměřených dat.....	27
4.6.1	Aritmetický průměr.....	27
4.6.2	Směrodatná odchylka.....	27
4.6.3	Relativní směrodatná odchylka.....	28
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	29
5.1	Optimalizace extrakce pro stanovení obsahu lipidů.....	29
5.1.1	Rozpouštědlo.....	29
5.1.2	Míchání.....	29
5.1.3	Doba extrakce.....	29
5.1.4	Optimalizace teploty.....	31
5.2	Předúprava vzorku.....	32
6	Závěr	35
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	36
8	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	40

1 ÚVOD

Mouční červy jsou larválním stádiem potměníka moučného, potměníka brazilského a potměníka buffalo. Jsou známí tím, že ve svých buněčných tkáních mají vysoký obsah lipidů i proteinů, a proto byli zvoleni jako vzorek k měření. Kvůli své vysoké výživové hodnotě jsou často využíváni jako krmení pro jiné živočichy. Velikost jejich larev se pohybuje v rozmezí mezi 1,5 – 2,0 cm.

Lipidy jsou zpravidla nepochybně látky přírodního původu, které jsou esenciální složkou výživy všech organismů. Slouží především jako zdroj energie, ale mají také funkci ochrannou, funkci izolační a jsou součástí biologických membrán. Jedna z hlavních charakteristik lipidů je jejich hydrofobnost – nerozpustnost ve vodě. V organických rozpouštědlech se však rozpouští velmi dobře, a proto jsou organická rozpouštědla často využívána k separaci lipidů ze vzorku.

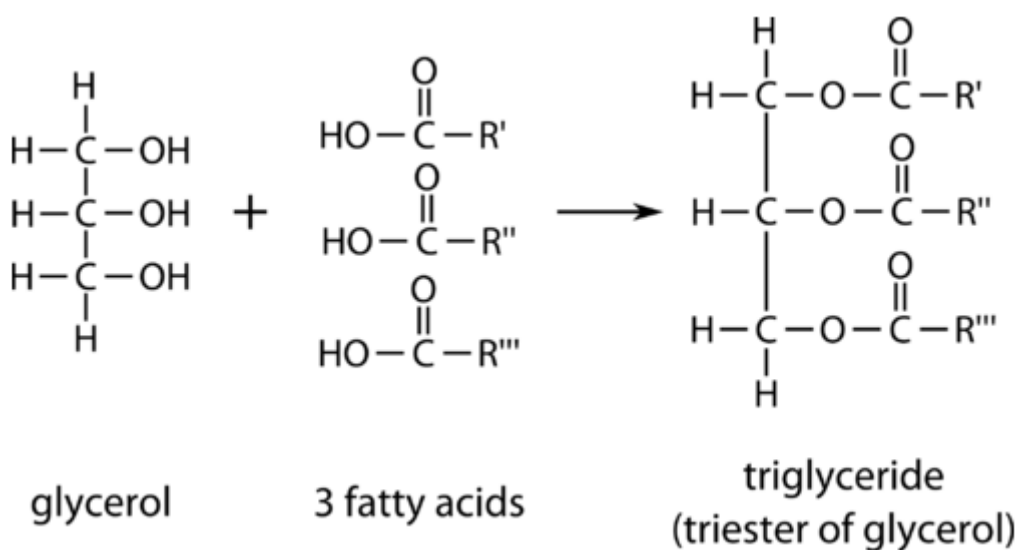
Pro stanovení obsahu lipidů v buněčných tkáních je nejpoužívanější metodou separace extrakce. Extrakci lze provádět metodami dle Soxhleta, dle Folche, dle Grossfelda a dalších. Dále je možné také přesně stanovit, o jaký typ lipidů se jedná, ale toto měření vyžaduje navíc nějakou z metod analytické separace – hmotnostní spektrometrii, chromatografii na tenké vrstvě či plynovou chromatografii.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lipidy

Lipidy jsou součástí buněk rostlin i živočichů. Pro lidské tělo jsou především zdrojem a rezervou energie. Z živin jsou lipidy nejbohatším zdrojem energie. Oxidací 1 g tuku získá organismus 38,9 kJ, což je více než dvojnásobné množství získané oxidací cukrů nebo bílkovin. [1]

Po chemické stránce lze lipidy zařadit mezi estery, tj. deriváty vyšší vyšších mastných kyselin (VMK) a alkoholu. [3] Obecná rovnice vzniku lipidů, tj. esterifikace je uvedena na (obrázku 1). Mastná kyselina (MK) dodává lipidu mastnou či olejovou povahu. Ve vodě jsou lipidy prakticky nerozpustné nebo jen velice špatně rozpustné. Špatná rozpustnost ve vodě je daná tím, že ve své molekule obsahují jen velice málo atomů schopných vytvářet polarizované vazby (O, N, S nebo P). [2]



Obrázek 1: Obecná rovnice vzniku lipidů

Lipidy lze podle jejich složení rozdělit na jednoduché lipidy, složené lipidy a odvozené lipidy.

2.1.1 Jednoduché lipidy

Jednoduché lipidy jsou estery vyšších mastných kyselin a alkoholů. Řadí se mezi ně tuky a vosky.

Je-li ester tvořen MK a trojsytným alkoholem glycerolem, pak mluvíme o tucích, respektive o acylglycerolech. Tyto lipidy tvoří převážnou část všech živočišných tuků a rostlinných olejů. Oleje jsou zpravidla nazývány tuky, které jsou v kapalném stavu.

Vosky jsou tvořeny MK a vyšším jednosytným nebo dvojsytným alkoholem. Vosky jsou za běžných podmínek nepolární a chemicky stabilní látky v pevném skupenství. [2]

2.1.2 Složené lipidy

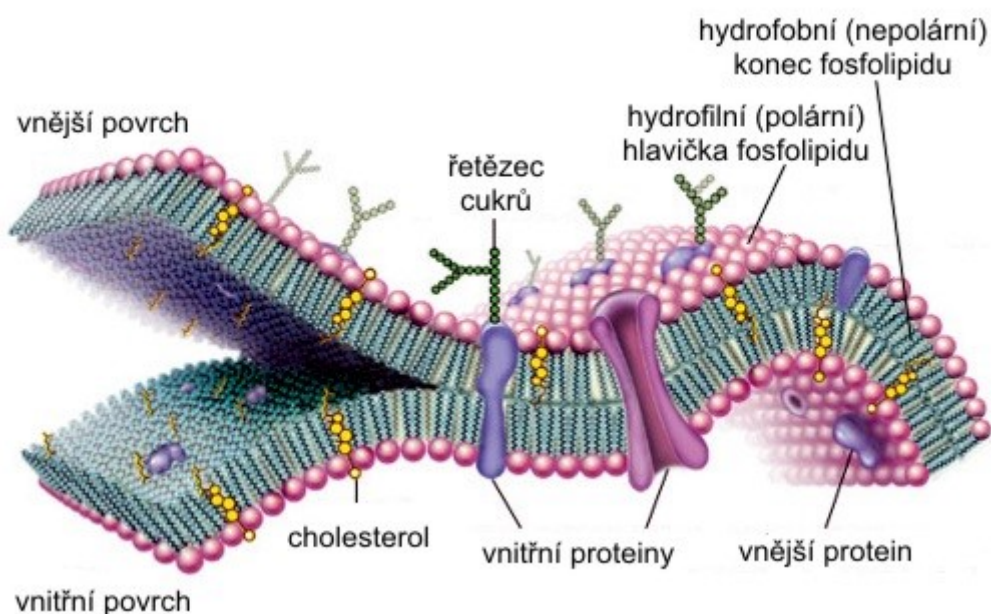
Složené lipidy obsahují, kromě esteru mastných kyselin a alkoholu, další funkční skupinu.

Pokud je touto funkční skupinou zbytek kyseliny fosforečné, mluvíme o fosfolipidech. Fosfolipidy jsou nejhojnějším zástupcem sloužených lipidů a v přírodě jsou nedílnou součástí biologických membrán. [6] Jejich molekuly jsou amfifilní – mají jeden konec hydrofilní a druhý hydrofobní. Hydrofobní konec je nepolární a obsahuje mastné kyseliny, zatímco

hydrofilní konec je polární a obsahuje alkohol a fosfátovou skupinu. [7] Nepolární řetězec mastných kyselin mají tendenci se orientovat k sobě, což má za následek vznik fosfolipidové dvojvrstvy (obrázek 2). Tato dvojvrstva je základem všech biomembrán. Zásadní vlastností této fosfolipidové dvojvrstvy je polopropustnost, která zamezuje nežádoucím molekulám v průchodu skrz. [9]

Významné jsou také glykolipidy. Obecně platí, že glykolipidy jsou složeny z mastné kyseliny, alkoholu a monosacharidu či oligosacharidu, který je navázán na jednu z hydroxylových skupin alkoholu. Podle toho zda je alkoholem glycerol nebo sfingosin rozlišujeme glycerolglykolipidy a sfingolipidy.

Do skupiny složených lipidů také patří lipoproteiny. Jedná se o makromolekulární látky skládající se z lipidů a bílkovin. Jejich funkcí je transport ve vodě nerozpustných lipidů prostředím krve. [10]



Obrázek 2: Fosfolipidová dvojvrstva [8]

2.1.3 Odvozené lipidy a jejich prekurzory

Mezi odvozené lipidy a jejich prekurzory patří všechny sloučeniny lipidní povahy, které nelze zařadit do některé z předchozích skupin. Řadí se mezi ně zejména steroidy, prostaglandiny, mastné aldehydy a vitamíny rozpustné v tucích. Všechny tyto látky hrají významnou roli v metabolismu lipidů. [2]

2.2 Mastné kyseliny

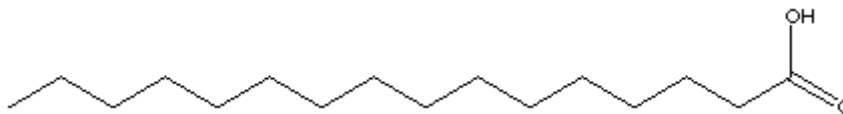
Jedná se o alifatické monokarboxylové kyseliny se zpravidla nevětveným řetězcem. Délka řetězce se pohybuje v rozmezí 3 – 24 uhlíků. V přírodě jsou mastné kyseliny většinou tvořeny sudým počtem atomů uhlíku, protože jejich biosyntéza probíhá adicí acetátu, který má dva uhlíky.

Dle délky řetězce dělíme mastné kyseliny na kyseliny s krátkým řetězcem ($C_3 - C_6$), kyseliny se středně dlouhým řetězcem ($C_8 - C_{12}$), kyseliny s dlouhým řetězcem ($C_{10} - C_{18}$) a kyseliny s velmi dlouhým řetězcem ($> C_{18}$). [7]

Podle stupně nasycení se dělí na nasycené, monoenoové, dienové, trienové a polyenoové.

2.2.1 Nasycené mastné kyseliny

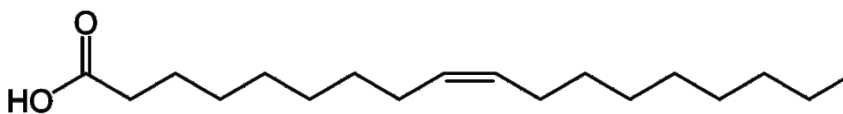
Nenasycené MK, označované též jako saturevané, jsou součástí přírodních lipidů. Zpravidla jsou tvořeny dlouhým nerozvětveným řetězcem, který neobsahuje žádnou dvojnou vazbu. Hlavními zástupci jsou kyselina palmitová (obrázek 3) a kyselina stearová.



Obrázek 3: Strukturní vzorec kyseliny palmitové

2.2.2 Monoenové mastné kyseliny

Jedná se o nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou. Mohou se lišit počtem uhlíků či prostorovou konfigurací. U přírodních lipidů platí, že se vyskytují téměř vždy ve formě *cis*. [7] Nejvýznamnějším zástupcem je kyselina olejová (obrázek 4).



Obrázek 4: Strukturní vzorec kyseliny olejové

2.2.3 Polyenové mastné kyseliny

Polyenové mastné kyseliny jsou nenasycené mastné kyseliny se dvěma či více dvojnými vazbami. Patří mezi ně skupina zvaná esenciální mastné kyseliny. Lidský organismus je potřebuje pro správnou funkci buněčných membrán, ale neumí si je vytvořit, a proto je musí přijímat z potravy. [11]

2.3 Buněčná tkáň

Jedná se o soubory buněk jednoho nebo více typů, které vykonávají stejnou funkci. Mají složité vnitřní členění, ale jejich povrch zpravidla bývá jednoduchý. [4]

Tkáně mohou vytvářet orgány nebo soustavy orgánů zajišťující životní funkce nezbytné pro každého živočicha. Mezi tyto funkce patří příjem a zpracování potravy, dráždivost, orientace v prostředí a schopnost pohybu.

Podle Köligera se tkáně obecně dělí na epitely, pojivové tkáně, tkáně svalové a tkáně nervové. [4]

2.3.1 Epitely

Epitely jsou tkáně rozprostřené do plochy z jedné nebo více vrstev buňky. Buňky na sebe těsně naléhají a obsahují minimum mezibuněčné hmoty. Hlavní funkcí epitelů je pokrývání povrchu těla nebo vnějšího či vnitřního povrchu orgánů. Lze je dále dělit dle tvaru, dle vrstev a dle funkce. [4]

2.3.2 Pojivové tkáně

Jedná se o tkáně prostorové, které vyplňují prostory mezi orgány nebo tyto orgány obalují. Na rozdíl od epitelů mají vysoký obsah mezibuněčné hmoty. Tato mezibuněčná hmota je sekretována buňkami a je tvořena vlákny bílkovin.

Podle charakteru mezibuněčné hmoty a podle úpravy buněk rozlišujeme tkáně vazovité, tkáně chrupavčité a tkáně kostní. Tkáně vazovité se skládají z rosolovité buněčné hmoty, jsou měkké, pružné a tvoří šlachy a vazy. Tkáně chrupavčité jsou pevné, pružné tkáně, tvořící chrupavku. Postrádají regenerační schopnost. Tkáň kostní je nejtvrdší pojivovou tkání

a tvoří kosti. Její mezibuněčná hmota obsahuje anorganické látky, převážně fosfor, vápník a sodík. [5][6]

2.3.3 Svalové tkáně

Nejdůležitějším úkolem svalových tkání je zajišťování pohybu. Pohyb je vykonáván pomocí svalových plotének, které mají schopnost se zkracovat. Svalové ploténky se skládají ze svalových vláken, myofibrilů. Podle uspořádání myofibrilů rozeznáváme svalstvo hladké, příčně pruhované a srdeční svalovinu. [5]

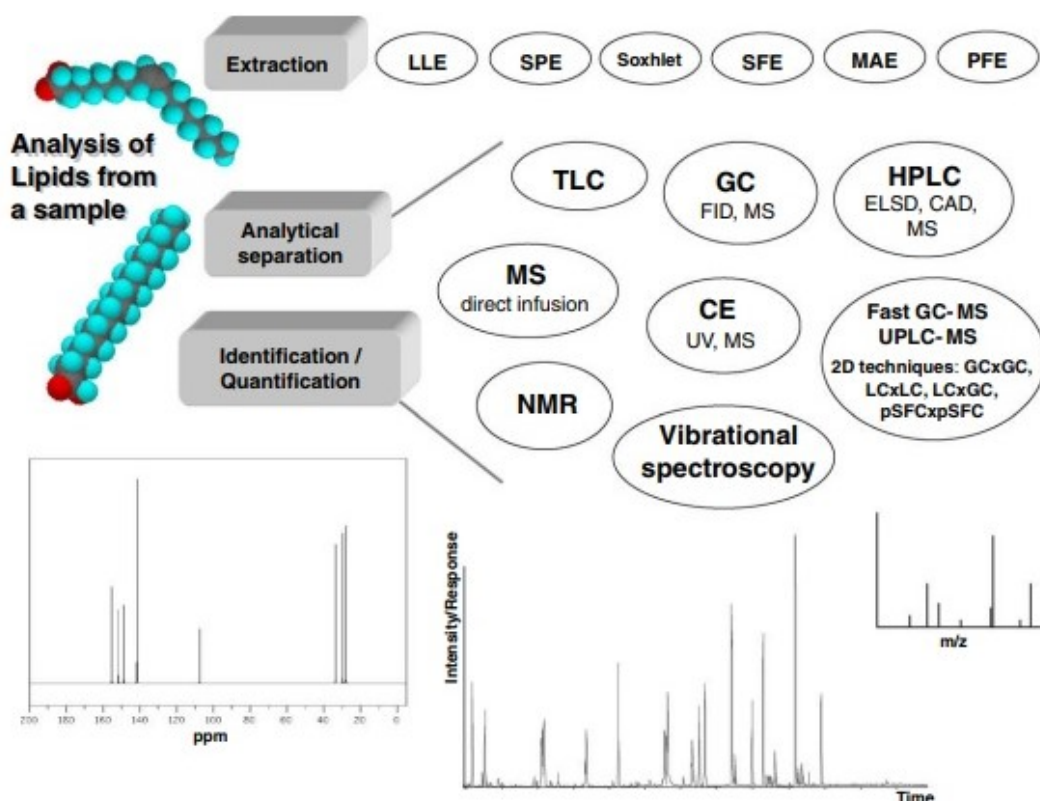
2.3.4 Nervové tkáně

Nervová tkáň je tkání řídící, která spojuje všechny buňky v těle v jeden harmonický celek. Tato tkáň je tvořena specializovanými buňkami zvanými neurony, které zaznamenávají vzrušivost a dráždivost. Tyto přenosy podráždění vedou k analýze podnětu a uložení těchto impulsů v paměti, čímž se vytváří podklad pro reflexní činnost. [4]

2.4 Metody stanovení lipidů

Pro stanovení obsahu lipidů existuje mnoho separačních metod. Zpravidla je pro daný vzorek volena jedna ze standardizovaných metod. Pro přesné složení lipidové fáze je nutné použít šetrnější analytickou metodu.

Obecně lze postup stanovení složky lipidové fáze popsat ve třech krocích – extrakce celé lipidové fáze ze vzorku, analytická separace jednotlivých lipidových složek a jejich identifikace a kvantifikace. [12] Rozdělení separačních metod do těchto tří kategorií je uvedeno na (obrázku 5).



Obrázek 5: Separační metody pro stanovení obsahu lipidů [12]

2.4.1 Extrakce lipidů

Před počátkem extrakce je důležité správně připravit vzorek. Před měřením by vzorek měl být uchován při nízké teplotě v uzavřené nádobě. Vzorek by měl být vysušený, aby voda neovlivňovala výsledky extrakce a rozdrcený, protože zmenšením částic vzorku dochází ke zvětšení plochy, na kterou se může rozpouštědlo navázat.

Cílem extrakce je, pokud možno co nejselektivněji, izolovat lipid z daného vzorku. Je známo několik různých typů extrakce lipidů. Vhodná metoda extrakce je zvolena podle povahy vzorku. Nejčastěji využívanou extrakcí zpravidla bývá extrakce tuhé matrice kapalným rozpouštědlem či směsí rozpouštědel. Je nutností používání velmi čistých rozpouštědel. Jedná se o účinnou metodu, která však také má své nedostatky, kterými jsou především časová a manuální náročnost. [14]

Podle druhu lipidu, který chceme separovat, se volí vhodné rozpouštědlo. Lipidy patří svou povahou mezi nepolární látky, a proto jsou nejlépe extrahovány nepolárními rozpouštědly (hexan, chloroform). Nepolární rozpouštědla rozrušují hydrofobní a van der Waalsovy interakce s matricí a lze je kombinovat s polárními rozpouštědly (ethanol, isopropanol), která mimo jiné zajišťují degradaci vodíkových můstků mezi lipidy a proteiny. [13][15]

2.4.1.1 Extrakce kapalina – kapalina (LLE)

LLE je levná a jednoduchá metoda založená na rozdílných rozpustnostech jednotlivých složek obsažených v daném vzorku. Jedná se o základní typ extrakce, kde dochází k rozpuštění jedné či více látek roztoku (vzorku) v rozpouštědle. Rozpouštědlo obohaceno o tuto látku se nazývá extrakt a původní roztok se nazývá rafinát. [17]

2.4.1.2 Extrakce podle Folche

Extrakce podle Folche je jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení obsahu lipidů v buněčných tkáních. Tato metoda je velmi efektivní při separaci fosfolipidů a neutrálních lipidů. Jako rozpouštědlo je použita směs chloroform:methanol v poměru 2 : 1. Po smíchání vzorku s rozpouštědlem dochází k homogenizaci. Proces homogenizace by měl být prováděn v krátkém časovém intervalu a za nízké teploty. Přidáním vody v množství 20 % celkového objemu rozpouštědla dojde k rozdělení roztoku na dvě vrstvy. Vrchní vrstva obsahující methanol a vodu je odstraněna centrifugací. Ze spodní vrstvy obsahující lipid a chloroform je odpařeno rozpouštědlo na vakuové odparce, čímž je separován čistý lipid. [16]

2.4.1.3 Extrakce podle Soxhleta

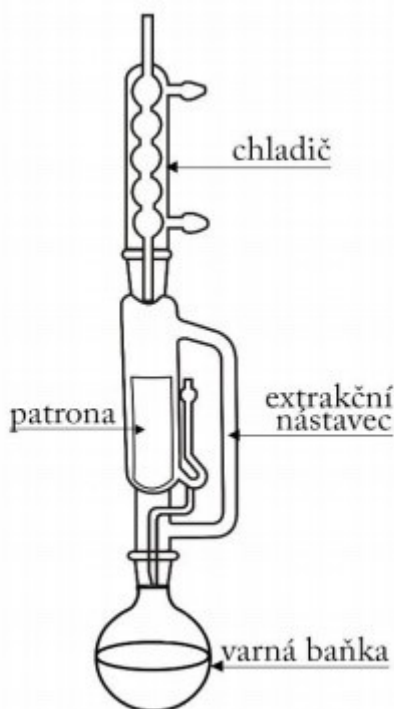
Extrakce v Soxhletově extraktoru je metoda, která patří mezi nejstarší extrakční techniky, a proto často bývá používána jako standard pro nově vyvíjené extrakční techniky. Je součástí mnohých normovaných postupů, např. extrakce lipidů metodou podle Soxhleta je popsána normou ČSN 46 7092-7 [40].

Aparatura potřebná ke Soxhletově extrakci se skládá z varné baňky, Soxhletova extraktoru, který má v sobě umístěnou patronu a chladiče (*obrázek 6*). Rozpouštědlo ve varné baňce je zahříváno, dochází k jeho odpaření a přes chladič je kondenzováno do patrony, ve které je umístěn navážený tuhý vzorek. Ze vzorku jsou rozpouštědlem vymývány rozpustné komponenty a poté je rozpouštědlo obsahující rozpuštěné analyty vráceno zpět do varné baňky a tento proces je opakován, dokud nejsou požadované komponenty ze vzorku vyextrahovány v dostatečném množství.

Vzorek je vždy extrahován čistým rozpouštědlem, zatímco ve varné baňce jsou koncentrovány netěkavé složky vyextrahované ze vzorku. Izolované látky tedy musí být stabilní při teplotě varu použitého extrakčního rozpouštědla. [19]

Hlavní výhodou extrakce podle Soxhleta je, že obsluha aparatury je velmi jednoduchá a pořizovací náklady nejsou vysoké. Nevýhodou však je, že celý proces je velmi zdoluhavý, pohybuje se v rozmezí 6 – 48 h. Další nevýhodou je, že většinou není možné použít směs rozpouštědel, protože rozpouštědla mají rozdílné teploty varu. [19]

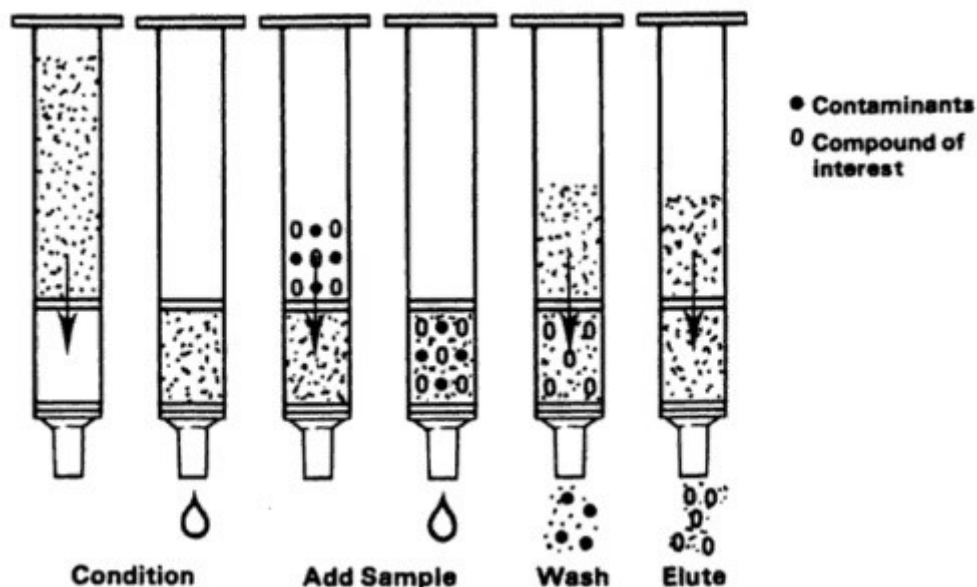
Byly vyvinuty modernější techniky založené na principu extrakce podle Soxhleta. Nejvýznamnější z nich se nazývá Soxtec. Hlavní modifikací této metody je, že vzorek je v určité fázi procesu přímo ponořen do extrakčního rozpouštědla, čímž je celý proces výrazně urychlen (z 6 – 48 h na 2 – 3 h). Zvýšení teploty však může vyvolat degradaci vzorku u tepelně nestabilních materiálů, a proto tato metoda zpravidla není doporučována k extrakci lipidů. [20]



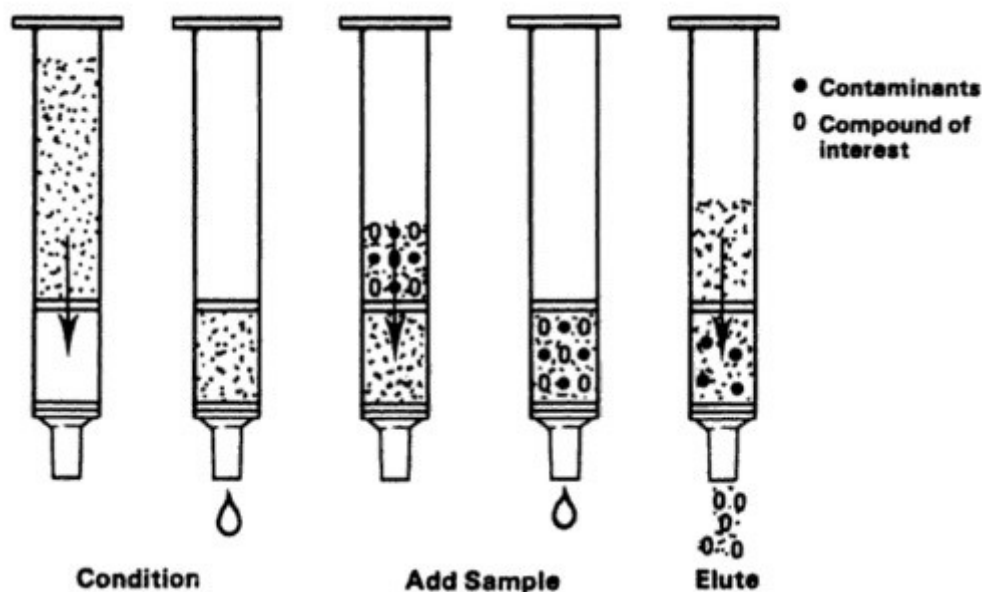
Obrázek 6: Soxhletův extraktor [18]

2.4.1.4 Extrakce na pevné fázi (SPE)

Extrakce na pevné fázi má unikátní schopnost a to rozdělit vzorky do skupin lipidů na základě rozdílné polaritativy komponent. Její princip se opírá o mechanismus kapalinové chromatografie a spočívá v zachycení sledovaných sloučenin vzorku na speciálním sorbentu uvnitř kolony. Tyto sloučeniny jsou zachyceny kvůli silným, ale reversibilním interakcím mezi analytem a povrchem stacionární fáze. Těmito interakcemi nejčastěji bývají van der Waalovy síly, vodíkové můstky, síly dipól-dipól nebo iontově výměnné interakce. Nežádoucí příměsi jsou z kolony vymyty vhodně zvoleným rozpouštědlem. Posledním krokem je eluce, kde jsou sloučeniny vzorku, již v čistém stavu, z kolony separovány rozpouštědlem (obrázek 7). Pokud víme, jaké nečistoty vzorek obsahuje, tak je můžeme za použití vhodného rozpouštědla v koloně pozdržet a rovnou separovat čisté sloučeniny vzorku, čímž se celý proces o jeden krok zkrátí (obrázek 8). [21]



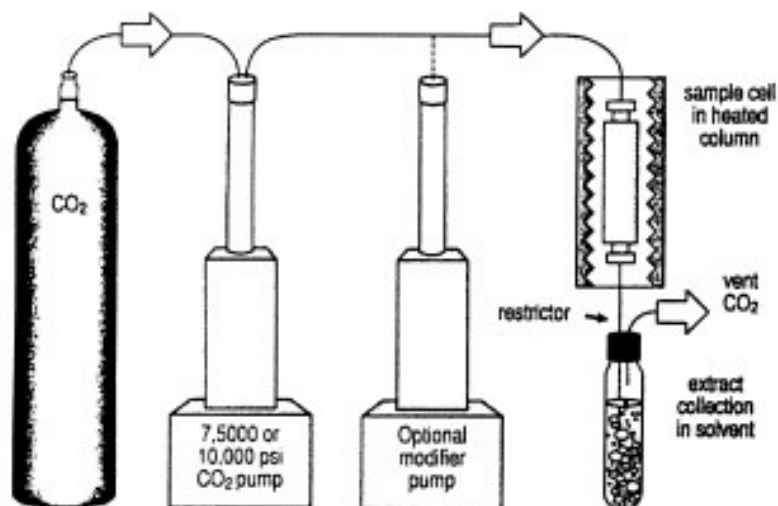
Obrázek 7: SPE – přidání vzorku, odstranění nečistot a separace sloučeniny vzorku [21]



Obrázek 8: SPE – přidání vzorku, zachycení nečistot v koloně a separace sloučeniny vzorku [21]

2.4.1.5 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Superkritická fluidní extrakce je založená na rozpustnosti složky vzorku (lipidu) v rozpouštědle, které je v superkritickém stavu. Nejběžněji se jako rozpouštědlo využívá oxid uhličitý, který má kritickou teplotu 31 °C. Při vyšší teplotě dochází ke zvyšování hustoty plynu, což vede k vzrůstu jeho schopnosti rozpouštět látky. Většina extrakcí probíhá při tlaku 100 – 300 bar a 40 – 50 °C. Aparatura používaná k superkritické fluidní extrakci je uvedena na (obrázku 9). [22]



Obrázek 9: Diagram SFE aparatury [22]

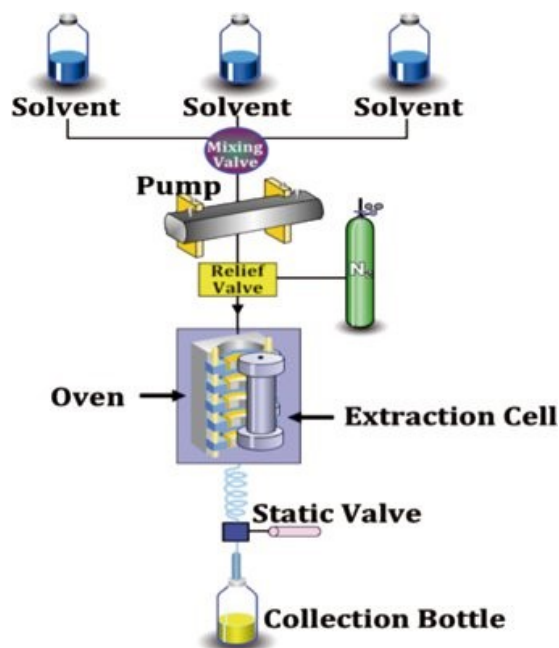
2.4.1.6 Extrakce pomocí mikrovln (MAE)

Extrakce pomocí mikrovln je široce užívanou moderní metodou. Principem této metody je, že organické rozpouštědlo, které je ve styku se zkoumaným vzorem, je ohříváno pomocí mikrovlnné energie o frekvenci přibližně 2,5GHz. Její hlavní předností jsou nízká spotřeba rozpouštědla, krátký čas extrakce a vysoká efektivita extrakce.

Dělí se na air-MAE, kde extrakce probíhá v otevřeném systému za atmosférického tlaku a pressurized-MAE, probíhající v uzavřeném prostoru za zvýšeného tlaku. Zvýšený tlak výrazně urychluje rychlost průběhu extrakce. [23]

2.4.1.7 Přetlaková fluidní extrakce (PFE)

Jedná se o rychlou, automatizovanou extrakční metodu, jež využívá vysoké teploty (200 °C) a tlaku (1500 psi) ke zlepšení efektivity extrakčního procesu. Vysoký tlak zajišťuje, že organická rozpouštědla zůstanou v kapalném stavu i za vysokých teplot. Tato metoda se využívá k separaci lipidů z tuhých vzorků. Celý proces je znázorněn na (obrázku 10). [24]



Obrázek 10: Schéma aparatury pro PFE [24]

2.4.2 Analytická separace, identifikace a kvantifikace lipidů

Analytické separace jsou nezbytné pro přesné stanovení typu a množství jednotlivých druhů lipidů. Hlavními metodami jsou různé druhy chromatografií, hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetická rezonance.

2.4.2.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Jedná se o jednu z nejstarších analytických metod, která však stále nachází své uplatnění. Je to vcelku levná a rychlá metoda, a proto je často využívána jako zkušební metoda při analýze nějakého velmi složitěho lipidu. Také se využívá k dělení neutrálních lipidů a fosfolipidů. Jejím principem je, že k separaci dochází ve stacionární fázi (standardně silikagel) a to z důvodu rozdílu polarit mezi analyty. [25]

2.4.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie (LC) i vysokoúčinná kapalinová chromatografie mají široké uplatnění v oblasti analýzy lipidů z důvodu, že existuje velké množství HPLC metodik pro analýzu lipidů. K separaci dochází ve stacionární fázi za vysokého tlaku. Touto metodou lze provést velmi kvalitní analýzy. HPLC obvykle dokáže rozdělit lipidy do základních skupin podle složení. [25]

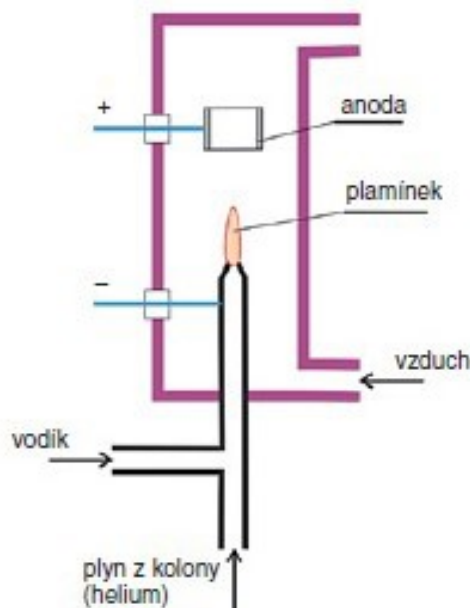
K detekci separovaných látek se zpravidla užívá obecných nebo specifických vlastností, kterými se tyto látky liší od mobilní fáze. Pro analýzu lipidů jsou detektory převážně založeny na detekci indexu lomu (RID), elektrochemické detekci (ECD) a evaporativní light-scattering detekci (ELSD). [12]

2.4.2.3 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie od sebe odděluje složky obsažené ve vzorku, které mohou být převedeny do plynné fáze, aniž by došlo k jejich rozkladu. Plynový chromatograf využívá při provozu mnoho různých plynů v závislosti na konkrétním typu analyzátoru a detektoru. Použití optimálního speciálního plynu a příslušenství při provádění plynové chromatografie významně zlepší přesnost analytických výsledků. Nosný plyn se používá k přenosu vzorku kolonou plynového chromatografu. [26]

Lipidy jsou zpravidla analyzovány pomocí plamenově ionizačního detektoru (FID) (*obrázek 11*). FID detektor nám poskytuje velmi přesnou informaci o složení vzorku, jeho nevýhodou však je, že měřením dojde k destrukci vzorku.

FID detektor musí obsahovat vodík a syntetický vzduch, protože tyto plyny slouží jako palivo. Vzorek je spalován vodíkovým plamenem, přičemž vznikají kladné a záporné ionty. Nabité částice v nosném plynu vytvářejí měřitelný tok proudu v prostoru mezi dvěma elektrodami detektoru. Výsledný tok proudu má větší intenzitu než tok proudu vzniklého při průtoku pouze čistého nosného plynu a vodíku. Rozdíl změřeného signálu podává přesnou informaci o vzorku, protože proud je přímo úměrný ionizaci, která závisí na složení vzorku. [27]



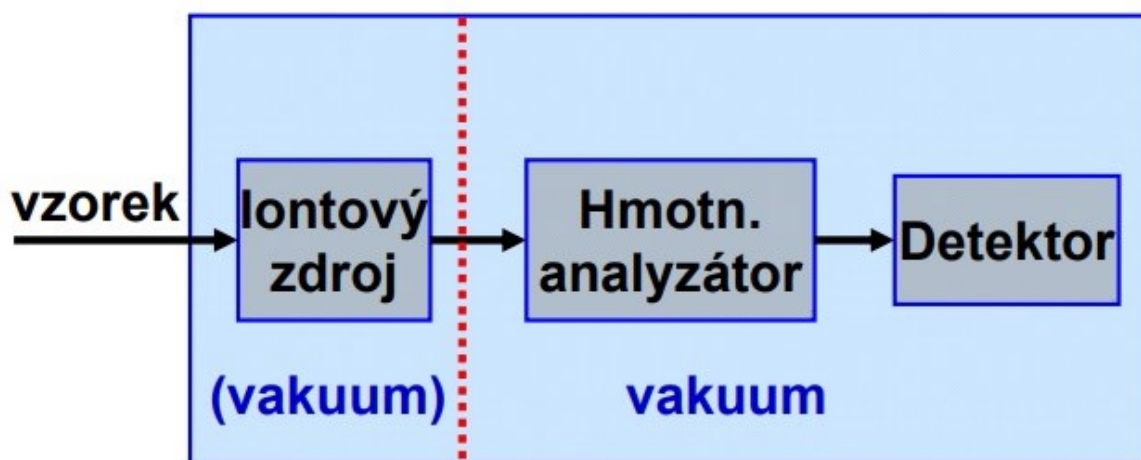
Obrázek 11: Plamenově ionizační detektor [27]

2.4.2.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Jedná se o analytickou metodu, která převádí molekuly na ionty, rozlišuje tyto ionty podle poměru hmotnosti a náboje a následně zaznamenává relativní intenzity jednotlivých iontů. Tato metoda má vysokou citlivost, na měření stačí pouze malé množství vzorku a je vhodná na kvalitativní i kvantitativní analýzu. Její nevýhody jsou vysoké pořizovací náklady a měřením dochází k destrukci vzorku. [28]

MS se skládá ze tří základních částí a to iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru (obrázek 12). Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace), hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a detektor slouží k detekci iontů po jejich rozdělení podle m/z a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů. [28]

Hmotnostní spektrometrie se často kombinuje s plynovou nebo kapalinovou chromatografií, např. GC-MS je vhodná metoda pro analýzu mastných kyselin.



Obrázek 12: Schéma hmotnostního spektrometru [28]

2.4.2.5 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Jde o analytickou metodu, která na základě absorpce radiofrekvenčního záření vzorkem umístěným v silném magnetickém poli poskytuje informace o struktuře zkoumané látky.

Tato metoda je univerzální metodou pro analýzu lipidů. Relativní množství a částečné určení majoritní lipidové třídy (diacylglyceroly, triglyceridy, fosfolipidy, sfingolipidy a steroidy) může být stanoveno okamžitě z ^1H spektra z nefrakcionovaných extraktů lipidů. [29]

2.5 Současný výzkum v oblasti separace lipidů

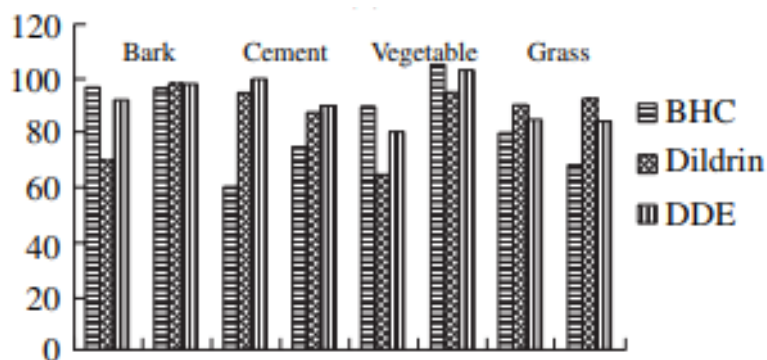
2.5.1 Srovnání metod extrakce podle Soxhleta a MAE

Sanghi a kolektiv se v práci [31] zabývali srovnáním extrakce podle Soxhleta a extrakce pomocí mikrovln. Extrakce podle Soxhleta je již dlouhodobě jednou z nejvyužívanějších metod extrakce, zatímco extrakce pomocí mikrovln patří mezi mnohem novější metody, a proto prozatím není využívána v tak hojném množství.

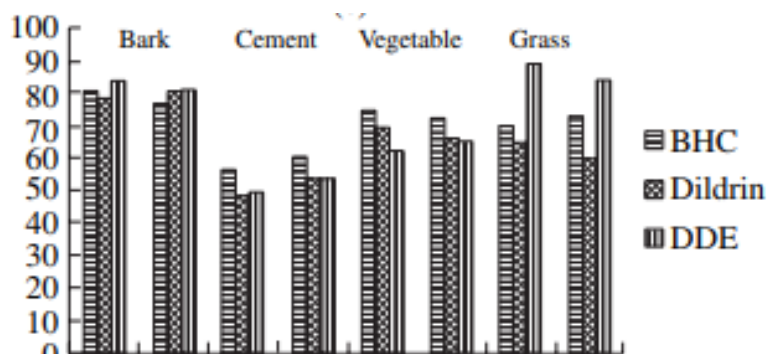
Jako vzorky byly použity kůra, cement, tráva a zelenina. Tráva a zelenina pocházely z organické farmy. Přístrojem použitým pro MAE byl MDS-1200 obsahující zdroj mikrovln o síle 1200 W. Rozpouštědlem byla směs hexanu a acetonu v poměru 1 : 1. Cílem extrakce bylo separovat pesticidy BHC (1,2,3,4,5,6-hexachloro cyclohexane), DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethene) a Dieldrin (1,2,3,4,10,10-hexachloro-6,7-epoxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a, octahydro-1,4,5,8-dimethano naphthalene).

Všechny vzorky o hmotnosti 0,5 kg byly rozemlety či rozřezány na nejmenší možné kousíčky. Pro samotnou extrakci bylo poté použito 2 g od každého vzorku pro MAE a 20 g od každého vzorku pro měření extrakce podle Soxhleta. Vzorky byly smíchány s rozpouštědlem o objemu 5 ml pro MAE a 150 ml pro extrakci podle Soxhleta. Doba extrakce se také lišila a to 5 min pro MAE a 240 min pro extrakci podle Soxhleta.

Na základě množství separovaných pesticidů u všech testovaných vzorků (obrázky 13, 14) lze konstatovat, že extrakce pomocí mikrovln dosahuje lepších výsledků než extrakce podle Soxhleta.



Obrázek 13: Graf znázorňující množství získaných pesticidů, měřeno MAE



Obrázek 14: Graf znázorňující množství získaných pesticidů, měřeno extrakcí podle Soxhlet

2.5.2 Vliv teploty a vlhkosti na extrakci lipidů za vysokého tlaku

Práce [32] se zabývala vlivem teploty a vlhkosti na extrakci tuků při vysokých tlacích. K experimentu byla jako vzorek použita skupina několika typů zelených řas. Zmrzlé vzorky řas byly rozmíchány ve vodě v různých poměrech, čímž byla získána řada vzorků o různé vlhkosti. Ke vzorkům bylo přidáno malé množství křemeliny, která zvýšila pórovitost vzorku a celá tato směs byla vložena do extrakční cely.

K extrakci lipidů bylo použito přístroje, u kterého šlo jednoduše měnit teplotu, a přitom dokázal zachovat konstantní tlak. Jako rozpouštědlo byl použit hexan. Spolu s hexanem byl přidáván i stlačený dusík. Dusík byl přidáván až do doby, než bylo v komoře dosaženo tlaku 10,3 MPa, který byl zachován a nadále udržován konstantní. Bylo provedeno několik měření pro 6 různých teplot - 70, 80, 90, 100, 110 a 120 °C. Po extrakci byl substrát odebrán do plastové nádoby a za mírného proudu dusíku vysušen. Nakonec byl gravimetrickou metodou stanoven obsah lipidů v daném substrátu. Autoři vyhodnotili měření tak, že nejlepší extrakce bylo dosaženo u vzorku, který měl poměr řas a vody 1 : 1 (vlhkost 50 %) a jehož extrakce probíhala za teploty 120 °C.

2.5.3 Extrakce lipidů z tkání nízko-toxickým rozpouštědlem

V práci [30] se Hara a kolektiv zabývali srovnáním výsledků extrakcí za použití rozpouštědel chloroform:methanol v poměru 2 : 1 a hexan:isopropanol v poměru 3 : 2.

K prvnímu měření bylo použito 1 g myšího mozku a přidalo se 18 ml rozpouštědla hexanu s isopropanolem. Směs byla míchána po dobu 30 s a poté přefiltrována na Büchnerově nálevce. Filtrát byl několikrát promyt 2 ml rozpouštědla a následně vysušen. Další pokus byl proveden úplně stejným způsobem, pouze místo hexanu byl jako rozpouštědlo použit chloroform:methanol a bylo pozorováno, jak se výsledky lišily.

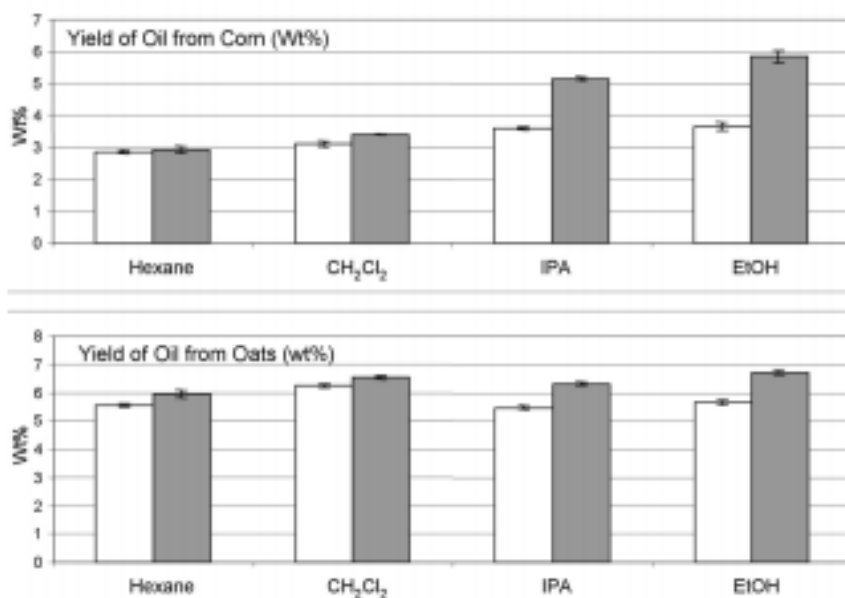
Extrakt hexanu obsahoval méně nelipidových nečistot a po jeho vysušení bylo možné ho ihned vložit do chromatografické kolony na analýzu. Extrakt chloroformu měl příliš vysokou hustotu, a proto bylo nutné ji snížit zvýšením zastoupení methanolu v roztoku. Výsledky plynové chromatografie potvrdily, že oba typy rozpouštědel dosahují podobných výsledků v množství extrahovaných lipidů. Z hlediska toxicity bylo autory stanoveno, že rozpouštědlo hexan:isopropanol je mnohem šetrnější k životnímu prostředí, a proto by bylo vhodnějším rozpouštědlem pro další experimenty.

2.5.4 Extrakce lipidů z kukuřice a ovsu za sníženého tlaku

Práce [33] se zabývá extrakcí lipidů z rozdrčené kukuřice a ovsu. Autoři vždy vzali 2 g vzorku a smíchali ho se stejným množstvím mořského písku. Poté byl vzorek vložen do extraktoru Dionex ASE 200 Accelerated Solvent Extractor. Ke každé extrakci bylo použito

jednoho ze čtyř druhů rozpouštědel - hexan, dichlormethan, isopropanol a ethanol. Všechny vzorky byly extrahovány při teplotách 40 a 100 °C a tlaku 1000 psi.

Rozdrcená kukuřice dosáhla hodnot extrahovaných lipidů od 2,9 do 5,9 hm. %. Oves měl hodnoty extrahovaných lipidů vyšší a to mezi 5,5 a 6,7 hm. %. U všech vzorků platilo, že při 100 °C bylo vyseparováno vyšší množství lipidů než při 40 °C. Na (obrázku 15) je uveden graf znázorňující, kolik procent lipidů bylo získáno jednotlivými extrakcemi.



Obrázek 15: Výtěžky lipidů z kukuřice a ovsu, bílé sloupce 40 °C, černé sloupce 100 °C

2.5.5 Superkritická extrakce lipidů

Chen a kolektiv se v práci [34] zabývali 5 zásadními parametry při extrakci lipidů – poměr rozpouštědel ethanolu a hexanu, poměr rozpouštědla a biomasy, teplota v průběhu extrakce, tlak extrakce a čas extrakce.

Celý experiment byl prováděn na řasách, které až do počátku extrakce byly zmrazeny na –80 °C a obsahovaly 65 % vody. Postup experimentu byl: extrakce v rozpouštědlech ethanolu a hexanu za přítomnosti dusíku, poté centrifugace, kterou byla oddělena ethanolová fáze od fáze hexanové. Hexan byl z hexanové fáze odpařen a vysušený filtrát obsahující lipidy byl zvážen. Tento celý experiment byl proveden několikrát pro různé podmínky a výsledky byly vyhodnoceny.

Pro poměr ethanolu a hexanu byl stanoven jako nejlepší poměr 1 : 3, dalším navyšováním množství ethanolu se již počet získaných lipidů nezvyšoval.

Z hlediska teploty bylo zjištěno, že výtěžek lipidů prudce rostl až do teploty 90 °C. S rostoucí teplotou se snižovala viskozita roztoku a rozpustnost lipidů v hexanu je lepší při vyšších teplotách. Dalším zvyšováním teploty však začalo docházet k snížení výtěžnosti lipidů, a proto byla teplota 90 °C stanovena jako ideální.

Pro poměr rozpouštědel a biomasy byl stanoveno, že ideální poměr je 10:1, protože až do této hodnoty docházelo k radikálnímu nárůstu výtěžnosti. Dalším přidáváním rozpouštědla se výtěžnost zvyšovala pouze minimálně, a proto z ekonomického hlediska byl tento poměr zvolen jako optimální.

Ke stanovení tlaku byly provedeny pokusy při 0,8 a 1,4 MPa. Výrazně lepších výsledků bylo dosaženo při použití 1,4 MPa, protože za vyššího tlaku se rozpouštědlo snadněji dostalo do buněk řas a lipidy se efektivněji extrahovaly do hexanu.

Posledním měřením byla závislost na čase, kde byla prováděna řada měření v časovém rozmezí mezi 50 a 170 min. Z výsledků bylo patrné, že delší doba nijak nezvýšila množství separovaných lipidů, a proto byla jako ideální doba zvolena 50 min.

3 CÍLE PRÁCE

- Zpracování literární rešerše chemicko-inženýrských postupů získávání lipidů z buněčných tkání.
- Cílem této diplomové práce je určit, která metoda je k separaci lipidů z buněčných tkání nejvhodnější.
- U zvolené metody provést optimalizaci – stanovit ideální podmínky měření pro dosažení maximální výtěžnosti lipidů.
- Vyhodnocení a zpracování všech experimentů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Destilovaná voda (FCH VUT, $0,7 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)

n-hexan p.a. (MERCI, CAS 110-54-3)

isopropylalkohol p.a. (MERCI, CAS 67-63-0)

4.2 Přístrojové vybavení

4.2.1 Filtrační aparatura

Filtrační kolona (*obrázek 17*) se skládá z tělesa komory, kterou tvoří masivní nerezový prstenec opatřený na obou koncích gumovými o-kroužky a uzavřený dolním dílem s vývodem pro výtok kapaliny (nátrubek) a horním víkem kolony. Dno dolního dílu je pokryto ocelovou sítíkou a na ní je umístěna filtrační plachetka vystřižená z filtračního papíru.

Filtrační kolona se vkládá do filtrační aparatury (*obrázek 16*) tak, aby měřicí koncovka přivádějící tlakový vzduch přesně dosedla do vyfrézované prohlubně ve víku kolony. Měřicí koncovka je upevněna pomocí fixační matice.

Tlakový vzduch je nastavován vždy před vložením filtrační kolony do aparatury a jeho hodnota se sleduje pomocí manometru.



Obrázek 16: Filtrační aparatura



Obrázek 17: Filtrační kolona [35]

4.2.2 Hydraulický lis

Hydraulický laboratorní lis (*obrázek 18*) se používá k výrobě lisovaných tablet. Vzorek se vloží do nerezové formy o průměru 40,5 mm, uzavře se vrchní částí formy a při tlaku 10 MPa je zalisován do tablety.



Obrázek 18:Hydraulický lis

4.2.3 Magnetická míchačka s ohřevem

Magnetická míchačka s ohřevem MSH20-D (*obrázek 19*) má hliníkovou desku potaženou keramikou a za pomoci teplotního čidla dokáže stanovit momentální teplotu v daném roztoku. Jejím hlavním využitím je rozmíchání vzorku v rozpouštědlech, což je zásadním faktorem pro zlepšení výsledků extrakce.



Obrázek 19:Magnetická míchačka s ohřevem MSH20-D [36]

4.2.4 Konvekční skříňková sušárna

Sušárna PREMED KBC G-100/250 (*obrázek 20*) dosahuje teploty až 250 °C a využívá se převážně k odpaření vody ze vzorku.



Obrázek 20: Sušárna PREMED KBC G-100/250 [37]

4.3 Charakteristika vzorku

Jako vzorek biomasy byli zvoleni usušení mouční červy (obrázek 21) dodaní Mendelovou univerzitou v Brně. Jejich rozměry se pohybovaly mezi 1,5 – 2 cm. Ke každému měření bylo naváženo 5,0 g těchto červů a s využitím třecí misky s tloučkem byli rozdrceni na drobné kousíčky.



Obrázek 21: Usušení mouční červy

Ke stanovení zbytkového obsahu vody v sušině bylo naváženo 10,0 g červů, kteří byli na petriho misce vloženi na 2 h do sušárny. Sušení probíhalo za teploty 115 °C. Po ukončení sušení byl vzorek opět zvážen a porovnán s původní hodnotou. Rozdíl byl nulový, a proto nebylo nutné vzorky sušit před každým měřením.

Pro orientační odhadnutí množství lipidů obsažených v těchto červech bylo provedeno měření na hydraulickém lise. Nerezová forma o průměru 40,5 mm byla naplněna 2,85 g červů, uzavřena víkem a za tlaku 10 MPa byla vytvořena tableta (obrázek 22). Zvážením tablety a tuku, který se v průběhu lisování uvolnil do filtračního papíru, byla stanovena přibližná hodnota lipidů zastoupených v daném vzorku. Množství tuku a jeho procentuální zastoupení ve vzorku jsou uvedeny v (tabulce 1). Tímto měřením bylo zjištěno, že daný vzorek obsahuje zhruba 26,9 % lipidů.



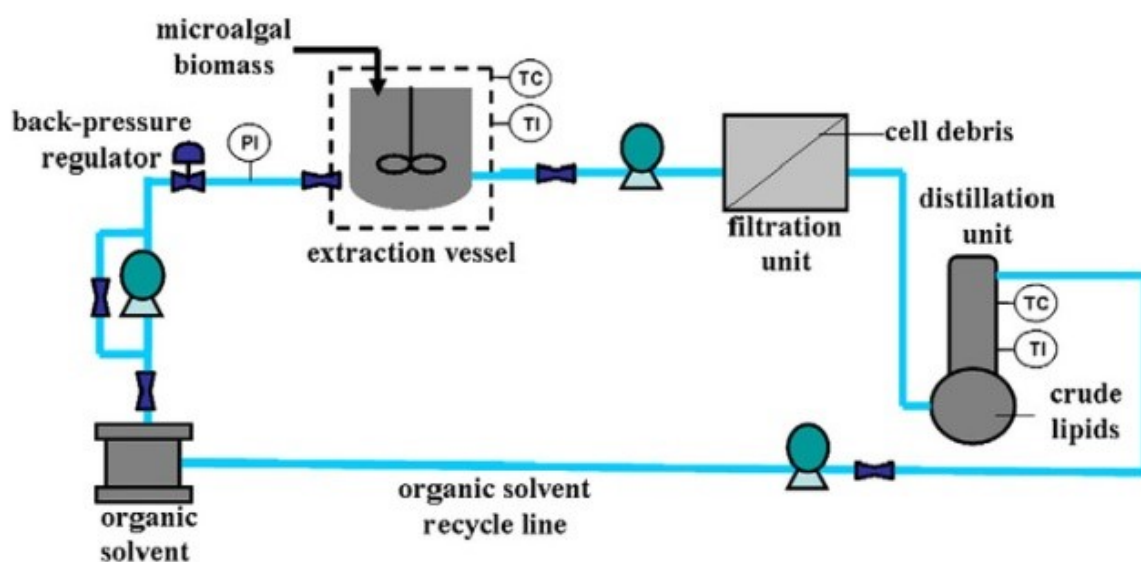
Obrázek 22: Tableta slisovaných moučných červů

Tabulka 1: Vzorky zalisované do tablety

$m_{\text{vzorek}} [\text{g}]$	$m_{\text{tuk}} [\text{g}]$	Tuk [%]
2,85	0,77	27,0
2,85	0,81	28,4
2,85	0,72	25,3

4.4 Extrakce lipidů

Pro přesné stanovení množství lipidů v daném vzorku byla použita metoda extrakce. Jedná se o nejeefektivnější metodu separace lipidů ze vzorku biomasy. Extrakce byla provedena dle schématu (obrázek 23). [38]



Obrázek 23: Schéma extrakce lipidů [38]

4.4.1 Princip metody

Navážený vzorek je rozmíchán v rozpouštědle. Lipidy se rozpustí v daném rozpouštědle a filtrací dojde k jejich oddělení od zbytku pevné fáze vzorku. Destilací je odpařeno rozpouštědlo a lipidy jsou separovány.

4.4.2 Pracovní postup

Bylo naváženo 5,0 g vzorku biomasy, který byl rozdrcen na malé kousíčky pomocí třecí misky s tloučkem. Vzorek byl vložen do kádinky položené na magnetické míchačce. Za stálého míchání 300 RPM bylo přidáno 50 ml rozpouštědla. Po určité době extrakce, která se lišila pro různá měření, byl roztok převeden do filtrační kolony, kde za sníženého tlaku došlo k oddělení pevné a kapalné složky. Filtr byl třikrát promyt 5 ml rozpouštědla a výsledný filtrát byl převeden do destilační kolony, kde za teploty 85 °C došlo k odpaření obou rozpouštědel, čímž byl vyseparován čistý tuk, který byl poté zvážen.

Nejčastěji používanými rozpouštědly pro extrakci tuků jsou chloroform:methanol v poměru 2 : 1 a hexan:isopropanol v poměru 3 : 2. Porovnáním obou typů rozpouštědel bylo určeno, že roztok hexanu s isopropanolem dosahuje lepších výsledků a zároveň je šetrnější k životnímu prostředí, a proto bylo ke všem měřením použito tohoto rozpouštědla v množství 30 ml n-hexanu a 20 ml isopropanolu.

Výpočet získaného tuku je popsán (rovnici 1),

kde:

m je obsah tuku ve vzorku [%]

m_b je hmotnost baňky s tukem – hmotnost prázdné baňky [g]

n je navážka vzorku [g]

$$m = \frac{m_b \cdot 100}{n} \quad (1)$$

4.5 Opakovatelnost

Podmínka opakovatelnosti měření zahrnuje stejný postup měření, stejný obslužný personál, stejný měřicí systém, stejné pracovní podmínky a stejné místo v krátkém časovém úseku. Statisticky představuje přesnost rozptylu výsledků kolem průměru, bez ohledu na to, jak správně průměr reprezentuje správnou hodnotu měřené veličiny.

4.6 Statistické vyhodnocení naměřených dat

K vyhodnocení naměřených dat byly použity tyto statistické veličiny: aritmetický průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

4.6.1 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je statistická veličina, která se zpravidla značí vodorovným pruhem nad proměnou a lze jej popsat jako součet všech veličin vydělený jejich počtem. Je definován vztahem popsaným (rovnici 2). [39]

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2)$$

4.6.2 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka charakterizuje rozptýlení jednotlivých hodnot x_i kolem aritmetického průměru \bar{x} a je mírou přesnosti série paralelních výsledků. (Rovnice 3) je vzorcem pro její výpočet. [39]

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (3)$$

4.6.3 Relativní směrodatná odchylka

Relativní směrodatná odchylka neboli variační koeficient udává procentuální rozptýlení od aritmetického průměru a počítá se podle (rovnice 4). [39]

$$s_r = 100 \frac{s}{\bar{x}} \quad (4)$$

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavním cílem experimentální části této práce bylo zvolení nejvhodnější metody k separaci lipidů z daného vzorku biomasy, její optimalizace a následné provedení dané metody, čímž bylo určeno přesné množství obsažených lipidů.

5.1 Optimalizace extrakce pro stanovení obsahu lipidů

Průběh a výsledek extrakce jsou závislé na několika parametrech – typ a množství rozpouštědla, rychlost otáček míchání, doba extrakce a teplota, za které extrakce vzorku probíhá.

5.1.1 Rozpouštědlo

Na základě článku [30], kde se autoři zabývají porovnáním různých typů rozpouštědel a normy ČSN 46 7092-7 [40], byla zvolena kombinace rozpouštědel hexan:isopropanol v poměru 3:2. Množství rozpouštědla bylo zvoleno tak, aby byl vzorek s jistotou ponořen po celý čas extrakce. Zvolené množství bylo 30 ml hexanu a 20 ml isopropanolu.

5.1.2 Míchání

Míchání roztoku je velmi důležitou součástí experimentu, aby extrakce zdárně probíhala. Magnetické míchadlo uvnitř kádinky se vzorkem a rozpouštědlem zajišťovalo, aby byl vzorek rovnoměrně rozmísen a mohlo docházet k efektivnímu rozpuštění lipidů v rozpouštědle. Rychlost míchání byla nastavena na 300 RPM.

5.1.3 Doba extrakce

Množství tuku získaného extrakcí je zásadně ovlivněno dobou extrakce. Bylo provedeno několik měření s cílem stanovení optimální doby pro separaci lipidů z biomasy. Výsledky měření jsou uvedeny v (*tabulkách 2, 3, 4, 5 a 6*), kde m_{vzorek} je hmotnost vzorku před extrakcí, m_{tuk} je hmotnost extrakcí vyseparovaného tuku a T je procentuální zastoupení tuku v daném vzorku.

(*Obrázek 24*) je výsledným grafem závislosti množství extrahovaného lipidu na čase. Z grafu vyplývá, že s přibývajícím časem rostlo i celkové množství získaného lipidu. První hodinu probíhala extrakce lipidů nejrychleji s téměř lineárním trendem a poté se její rychlost začala snižovat. Snížení rychlosti extrakce lipidů bylo způsobeno zmenšením koncentračního gradientu. Koncentrační gradient je závislý na koncentraci lipidů mezi buňkami vzorku biomasy a organickým rozpouštědlem. Koncentrace lipidů se z důvodu jejich rozpustnosti v rozpouštědle s přibývajícím časem snižuje.

Porovnáním získaného tuku s časem potřebným k jeho separaci byla nejoptimálnějším časovým intervalem zvolena doba extrakce 60 min.

Pro kontrolu výsledků byl jeden 30 min extrahovaný vzorek poslán na Veterinární a farmaceutickou univerzitu v Brně, kde provedli jeho analýzu a stanovili množství obsažených lipidů. Jejich testem bylo množství lipidů stanoveno na 30,79 %, což se od výsledku experimentálně zjištěného liší o méně než 1 %.

Tabulka 2: Extrakce probíhající 15 min

$m_{\text{vzorek}} [\text{g}]$	$m_{\text{tuk}} [\text{g}]$	T [%]
5,0	1,32	26,4
5,0	1,27	25,4
5,0	1,36	27,2

Průměrná hodnota získaného tuku po 15 min extrakce byla 26,3 %.

Tabulka 3: Extrakce probíhající 30 min

$m_{\text{vzorek}} [\text{g}]$	$m_{\text{tuk}} [\text{g}]$	T [%]
5,0	1,55	31,0
5,0	1,61	32,2
5,0	1,59	31,8

Průměrná hodnota získaného tuku po 30 min extrakce byla 31,7 %.

Tabulka 4: Extrakce probíhající 60 min

$m_{\text{vzorek}} [\text{g}]$	$m_{\text{tuk}} [\text{g}]$	T [%]
5,0	1,79	35,8
5,0	1,83	36,6
5,0	1,85	37,0

Průměrná hodnota získaného tuku po 60 min extrakce byla 36,5 %.

Tabulka 5: Extrakce probíhající 120 min

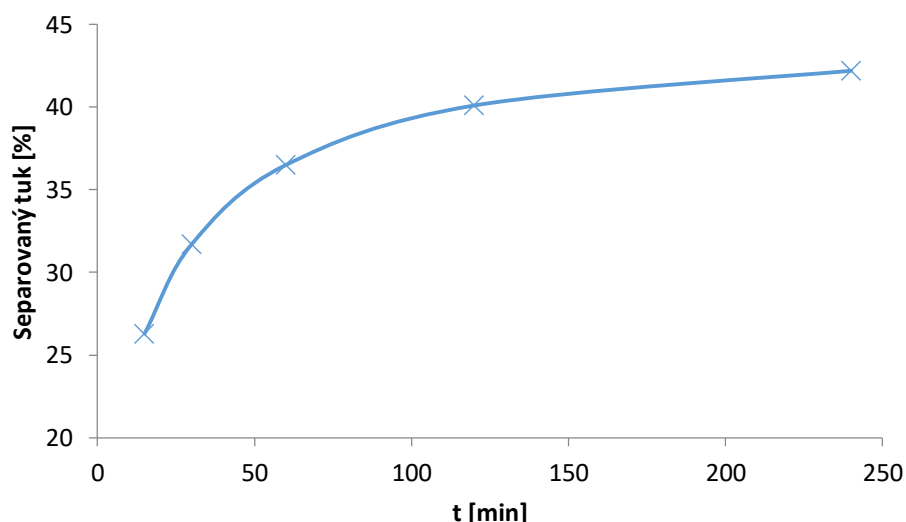
$m_{\text{vzorek}} [\text{g}]$	$m_{\text{tuk}} [\text{g}]$	T [%]
5,0	2,03	40,6
5,0	2,01	40,2
5,0	1,97	39,4

Průměrná hodnota získaného tuku po 120 min extrakce byla 40,1 %.

Tabulka 6: Extrakce probíhající 240 min

$m_{\text{vzorek}} [\text{g}]$	$m_{\text{tuk}} [\text{g}]$	T [%]
5,0	2,13	42,6
5,0	2,13	42,6
5,0	2,07	41,4

Průměrná hodnota získaného tuku po 240 min extrakce byla 42,2 %.



Obrázek 24: Graf závislosti extrakcí získaného tuku na čase

5.1.4 Optimalizace teploty

Teplota je dalším důležitým faktorem ovlivňujícím extrakci. Na rozdíl od předchozích extrakcí, které probíhaly vždy za pokojové teploty, byla u této řady experimentů na magnetické míchačce nastavena teplota v rozmezí 30 – 60 °C. Vyšší teplotu nebylo možné použít z důvodu rizika odpařování rozpouštědla (t_v hexanu je 69 °C). Za zvýšeného tlaku by však bylo možné tuto hranici teploty bezpečně překročit. Teplota byla po celou dobu experimentu snímána teplotním čidlem, které bylo ponořeno v kádince se vzorkem a s rozpouštědlem. Doba extrakce byla na základě výsledků předchozího měření zvolena stejná pro celou sérii experimentů – 60 min. V (tabulkách 7, 8, 9 a 10) jsou uvedeny výsledky měření.

Graf závislosti množství separovaného tuku na teplotě je na (obrázku 25). V grafu lze pozorovat, že s rostoucí teplotou dochází k lineárnímu nárůstu získaného tuku. Zvýšená teplota působí na reakci jako katalyzátor a zapříčiňuje zvýšení kinetického pohybu složek, což má za následek urychlení celé reakce.

Optimální teplotou k extrakci lipidů z buněčných tkání za atmosférického tlaku byla zvolena teplota 60 °C.

Tabulka 7: Extrakce probíhající za teploty 30 °C

m_{vzorek} [g]	m_{tuk} [g]	T [%]
5,0	1,84	36,8
5,0	1,83	36,6
5,0	1,82	36,4

Průměrná hodnota získaného tuku po 60 min extrakce při teplotě 30 °C byla 36,6 %.

Tabulka 8: Extrakce probíhající za teploty 40 °C

$m_{\text{vzorek}} [\text{g}]$	$m_{\text{tuk}} [\text{g}]$	T [%]
5,0	1,88	37,6
5,0	1,87	37,4
5,0	1,91	38,2

Průměrná hodnota získaného tuku po 60 min extrakce při teplotě 40 °C byla 37,7 %.

Tabulka 9: Extrakce probíhající za teploty 50 °C

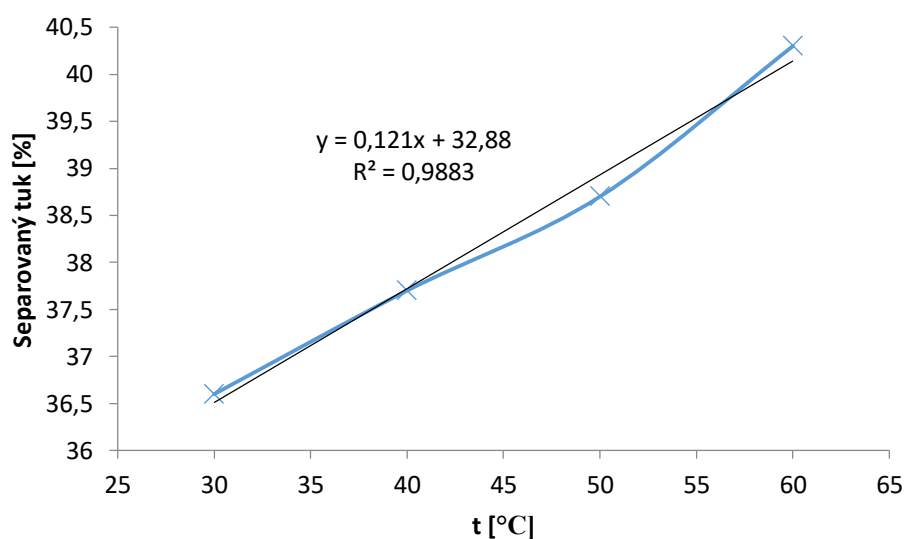
$m_{\text{vzorek}} [\text{g}]$	$m_{\text{tuk}} [\text{g}]$	T [%]
5,0	1,94	38,8
5,0	1,91	38,2
5,0	1,95	39,0

Průměrná hodnota získaného tuku po 60 min extrakce při teplotě 50 °C byla 38,7 %.

Tabulka 10: Extrakce probíhající za teploty 60 °C

$m_{\text{vzorek}} [\text{g}]$	$m_{\text{tuk}} [\text{g}]$	T [%]
5,0	2,05	41,0
5,0	1,99	39,8
5,0	2,01	40,2

Průměrná hodnota získaného tuku po 60 min extrakce při teplotě 60 °C byla 40,3 %.



Obrázek 25: Graf závislosti extrakce získaného tuku na teplotě

5.2 Předúprava vzorku

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda odstraněním chitinové pokožky moučných červů s využitím mechanických přístrojů lze navýšit množství extrahovaných lipidů. 100 g sušených moučných červů bylo posláno na Veterinární a farmaceutickou fakultu v Brně, kde byli

v několika krocích rozemletí a zbavení jejich pevné pokožky. V jednom z kroků došlo mimo jiné také ke smíchání vzorku s vodou.

Jak lze vidět na (obrázku 26), vzorek obsahoval vysoké procento vody. Bylo důležité stanovit množství vody a poté vzorek vysušit. Pro stanovení množství vody bylo 10,0 g vzorku vloženo do sušárny na 2 h při teplotě 115 °C. Hmotnost vzorku klesla sušením o 6,3 g, což znamená, že v 5 g vzorku bylo možné očekávat až 3,15 ml vody, a proto bylo vysušení vzorku před dalším měřením nezbytné.



Obrázek 26: Vzorek rozemletých červů před sušením

Po vysušení byl předupravený vzorek připraven k finálnímu kroku experimentu. 5 g tohoto vzorku bylo smícháno s rozpouštědlem a započala extrakce, která probíhala při teplotě 60 °C. Byly provedeny tři série měření pro časy 15, 30 a 60 min. Výsledky měření jsou uvedeny v (tabulkách 11, 12 a 13).

Graf závislosti množství separovaného tuku na době extrakce je na (obrázku 27). Z grafu je patrné, že s rostoucím časem se také lineárně zvyšovalo množství vyseparovaného tuku. Z výsledků vyplývá, že předúprava vzorku zlepšila výsledky extrakce, protože odstraněním pevné chitinové pokožky zajistila rozpouštědлу snazší přístup k buněčným tkání po celé ploše vzorku.

Optimálních podmínek pro extrakci bylo dosaženo při 60 °C, době extrakce 60 min a s použitím rozmixovaného vzorku.

Tabulka 11: Extrakce probíhající 15 min za teploty 60 °C

$m_{\text{vzorek}} [\text{g}]$	$m_{\text{tuk}} [\text{g}]$	T [%]
5,0	1,62	32,4
5,0	1,57	31,4
5,0	1,58	31,6

Průměrná hodnota získaného tuku po 15 min extrakce při teplotě 60 °C byla 31,8 %.

Tabulka 12: Extrakce probíhající 30 min za teploty 60 °C

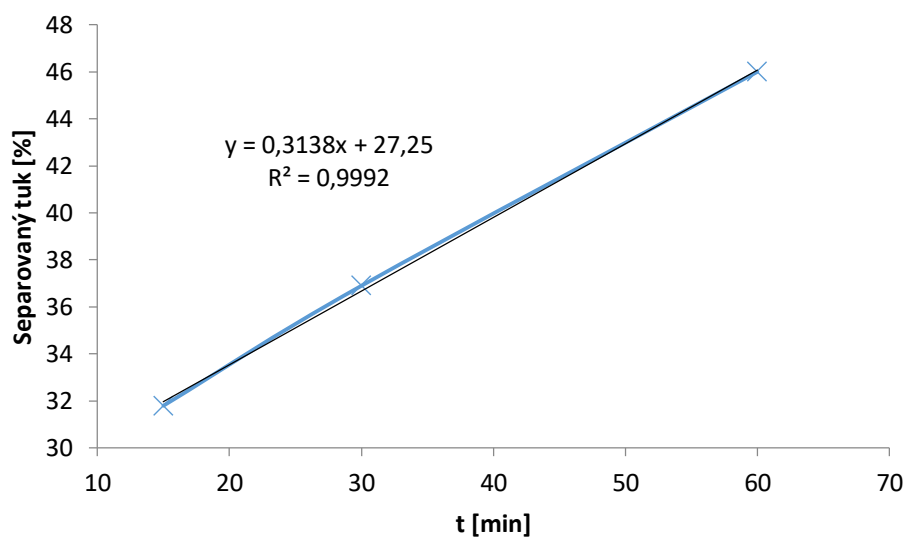
$m_{\text{vzorek}} [\text{g}]$	$m_{\text{tuk}} [\text{g}]$	T [%]
5,0	1,83	36,6
5,0	1,86	37,2
5,0	1,84	36,8

Průměrná hodnota získaného tuku po 30 min extrakce při teplotě 60 °C byla 36,9 %.

Tabulka 13: Extrakce probíhající 60 min za teploty 60 °C

$m_{\text{vzorek}} [\text{g}]$	$m_{\text{tuk}} [\text{g}]$	T [%]
5,0	2,28	45,6
5,0	2,31	46,2
5,0	2,31	46,2

Průměrná hodnota získaného tuku po 60 min extrakce při teplotě 60 °C byla 46,0 %.



Obrázek 27: Graf závislosti separovaného tuku z rozmixovaného vzorku na čase

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se věnovala separaci lipidů z buněčných tkání.

V teoretické části diplomové práce byla popsána problematika týkající se lipidů, buněčných tkání a chemicko-inženýrských postupů získávání lipidů s hlavním zaměřením na extrakci. Teoretická část obsahovala také informace o dřívějším i současném výzkumu v dané oblasti chemie.

Experimentální část této diplomové práce se zabývala principem nejvyužívanější metody k separaci lipidů z buněčných tkání, tj. extrakcí. Hlavní pasáží experimentální části bylo provedení a popsání optimalizace zásadních parametrů ovlivňujících průběh extrakce – typ a množství rozpouštědla, doba extrakce a teplota, při které extrakce probíhá.

Byla provedena řada experimentů a jejich výsledky byly porovnány. Rychlou (15 min) extrakcí za pokojové teploty bylo stanoveno množství separovaných lipidů ze vzorku na 26,3 %. Tato hodnota však vzrostla na 37,0 %, když byla doba extrakce prodloužena na 60 min. Hodnoty 40,3 % bylo dosaženo zvýšením teploty v průběhu extrakce na 60 °C. Největšího množství lipidů se podařilo vyseparovat kombinací několika faktorů ovlivňujících extrakci zároveň. Prodloužením doby extrakce na 60 min, zvýšením teploty na 60 °C a použitím rozmixovaného vzorku, který byl zbaven chitinové pokožky, bylo dosaženo 46,0 % separovaného lipidů.

Separace lipidů má široké uplatnění převážně v potravinářství a určitě se v této oblasti bude výzkum nadále rozvíjet.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Fyziologie výživy* [online]. [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: http://www.fsps.muni.cz/inovace-RVS/kurzy/fyziologie_vyzivy/8_metabolismus.html
- [2] *Struktura a funkce lipidů. Galenus* [online]. [cit. 2019-03-23]. Dostupné z: <https://www.galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-lipidy-struktura-lipidu>
- [3] MATOUŠ, Bohuslav. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, c2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [4] JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. 1. vyd. v ČR. Jinočany: H & H, 1997. vi, 502 s. ISBN 80-85787-37-7
- [5] DYLEVSKÝ, Ivan. *Somatologie – Učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium*. 1. vyd. Olomouc: EPAVA Olomouc s. r. o., 2000, 480 s. ISBN 978-80-86297-05-7
- [6] *Tkáně mnohobuněčných. BIOMACH* [online]. [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: <http://www.biomach.cz/biologie-zivocichua/tkane-mnohobunecnych>
- [7] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [8] *Stavba buněčných membrán*. In: *ELUC* [online]. [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/9>
- [9] *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2007, 36(1). ISSN 1056-8700. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biophys.36.040306.132643>
- [10] *Struktura a funkce lipoproteinů. Galenus* [online]. [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-struktura-a-funkce-lipoproteinu>
- [11] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [12] CARRASCO-PANCORBO, Alegría, Natalia NAVAS-IGLESIAS a Luis CUADROS-RODRÍGUEZ. From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2009, 28(3), 263-278. DOI: 10.1016/j.trac.2008.12.005. ISSN 01659936. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993608002811>
- [13] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [14] PĚKNICOVÁ, Markéta a Dagmar KRUCINOVÁ. *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín: 2 THETA, 1999. ISBN 80-902-4329-0

- [15] *Lipidy* [online]. In: *VŠCHT* . [cit. 2019-03-28]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~hajslovj/PDF_AP/AP_7.pdf
- [16] EGGERS, Lars F. a Dominik SCHWUDKE. Liquid Extraction: Folch. *Encyclopedia of Lipidomics*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016, 2016-5-11, , 1-6. DOI: 10.1007/978-94-007-7864-1_89-1. ISBN 978-94-007-7864-1. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7864-1_89-1
- [17] TANAKA, T. Traditional enzyme separation and preparation. *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality*. Elsevier, 2015, 2015, , 59-83. DOI: 10.1016/B978-1-78242-285-3.00003-X. ISBN 9781782422853. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978178242285300003X>
- [18] Soxhletův extraktor. In: *Interaktivní-chemie* [online]. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <http://interaktivni-chemie.cz/wp-content/uploads/23-extrakce.pdf>
- [19] Extrakční techniky. In: *Eknihovna* [online]. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52968
- [20] MITRA, S. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Hoboken, N.J.: J. Wiley, c2003. ISBN 04-713-2845-6.
- [21] PERKINS, Edward George. *Analyses of fats, oils, and derivatives*. Champaign, Ill.: AOCS Press, c1993. ISBN 09-353-1548-9.
- [22] CHEUNG, P. Temperature and pressure effects on supercritical carbon dioxide extraction of n-3 fatty acids from red seaweed. *Food Chemistry*. 65(3), 399-403. DOI: 10.1016/S0308-8146(98)00210-6. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814698002106>
- [23] SU, Yi, Shitou XIA, Ruozhong WANG a Langtao XIAO. Phytohormonal quantification based on biological principles. *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. Elsevier, 2017, 2017, , 431-470. DOI: 10.1016/B978-0-12-811562-6.00013-X. ISBN 9780128115626. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012811562600013X>
- [24] Recent Advances in Pressurized Fluid Extraction. *Chromatographyonline* [online]. [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/recent-advances-pressurized-fluid-extraction>
- [25] FUCHS, Beate, Rosmarie SÜß, Kristin TEUBER, Mandy EIBISCH a Jürgen SCHILLER. Lipid analysis by thin-layer chromatography—A review of the current state. *Journal of Chromatography A*. 2011, 1218(19), 2754-2774. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.11.066. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967310016547>
- [26] Aplikace v analytických laboratořích. *Airproducts* [online]. [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <http://www.airproducts.cz/industries/Analytical-Laboratories/analytical-lab-applications/product-list/gas-chromatography-gc-analytical-laboratories.aspx?itemId=E04BB35D53DE44E8B751BA27B577AC43>

- [27] Provozní plynové chromatografy. *Automa* [online]. [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: http://www.automa.cz/cz/casopis-clanky/provozni-plynove-chromatografy-2017_04_0_10151/
- [28] Hmotnostní spektrometrie. *Holčapek* [online]. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf
- [29] EL-GEWELY, M. R. *Biotechnology Annual Review*. 1. ed. Netherlands: Elsevier B. V., 2006. 422 s. ISBN 0-444-52724-9.
- [30] HARA, Atsushi a Norman S. RADIN. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*. 1978, 90(1), 420-426. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90046-5. ISSN 00032697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269778900465>
- [31] SANGHI, Rashmi a Sasi S. KANNAMKUMARATH. Comparison of Extraction Methods by Soxhlet, Sonicator, and Microwave in the Screening of Pesticide Residues from Solid Matrices. *Journal of Analytical Chemistry*. 2004, 59(11), 1032-1036. DOI: 10.1023/B:JANC.0000047004.71892.0e. ISSN 1061-9348. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/B:JANC.0000047004.71892.0e>
- [32] ISLAM, Muhammad Aminul, Richard J BROWN, Ian O'HARA, Megan KENT a Kirsten HEIMANN. Effect of temperature and moisture on high pressure lipid/oil extraction from microalgae. *Energy Conversion and Management*. 2014, 88, 307-316. DOI: 10.1016/j.enconman.2014.08.038. ISSN 01968904. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890414007626>
- [33] MOREAU, Robert A., Michael J. POWELL a Vijay SINGH. Pressurized liquid extraction of polar and nonpolar lipids in corn and oats with hexane, methylene chloride, isopropanol, and ethanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2003, 80(11), 1063-1067. DOI: 10.1007/s11746-003-0821-y. ISSN 0003021X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-003-0821-y>
- [34] CHEN, Min, Tianzhong LIU, Xiaolin CHEN, et al. Subcritical co-solvents extraction of lipid from wet microalgae pastes of *Nannochloropsis* sp. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2012, 114(2), 205-212. DOI: 10.1002/ejlt.201100120. ISSN 14387697. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201100120>
- [35] Filtrace. *E-learning VUT* [online]. [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <https://moodle.vutbr.cz/mod/resource/view.php?id=7851>
- [36] Magnetická míchačka MSH20-D. In: *VERKON* [online]. [cit. 2019-02-12]. Dostupné z: <https://www.verkon.cz/michacka-magneticka-wisd-wisestir-msh-d-s-ohrevem/>
- [37] Sušárny, sterilizátory, kryostaty, klimakomory. In: *LABO-MS* [online]. [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: <http://www.labo-ms.cz/pouit-laboratorn-vybaven/surny-steriliztory-kryostaty-klimakomory/330>

- [38] HALIM, Ronald, Michael K. DANQUAH a Paul A. WEBLEY. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(3), 709-732. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.001. ISSN 07349750. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975012000031>
- [39] *Učebnice statistiky*. Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové. ISBN 978-80-88176-00-8.
- [40] ČSN 46 7092-7. *Metody zkoušení krmiv: Část 7: Stanovení obsahu tuku*. Praha, 1998.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

MK	mastná kyselina
VMK	vyšší mastná kyselina
LLE	extrakce kapalina-kapalina
SPE	extrakce na pevné fázi
SFE	superkritická fluidní extrakce
MAE	extrakce pomocí mikrovln
PFE	přetlaková fluidní extrakce
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
LC	kapalinová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RID	detektor indexu lomu
ECD	elektrochemický detektor
ELSD	evaporativní light-scattering detektor
GC	plynová chromatografie
FID	plameně ionizační detektor
MS	hmotnostní spektrometrie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
NMR	nukleární magnetická rezonance
p.a.	chemikálie pro analytické účely
RPM	revolutions per minute (otáčky za minutu)
t_v	teplota varu